

BEST AVAILABLE COPY

501 9420/501947

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年4月1日 (01.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/027057 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/00, C12Q 1/00, C07K 19/00, C12N 5/10, G01N 33/68, 33/48

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011156

(22) 国際出願日: 2003年9月1日 (01.09.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-272043 2002年9月18日 (18.09.2002) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町4丁目1番8号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(73) 発明者/出願人(米国についてのみ): 梅澤 喜夫 (UMEZAWA,Yoshio) [JP/JP]; 〒162-0063 東京都 新宿区 市ヶ谷薬王寺町 45-1-203 Tokyo (JP). 小澤 岳昌 (OZAWA,Takeaki) [JP/JP]; 〒270-2231 千葉県 松戸市 稔台 617-18 Chiba (JP).

(74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA,Toshio); 〒150-0042 東京都 渋谷区 宇田川町 37-10 麻仁ビル 6階 Tokyo (JP).

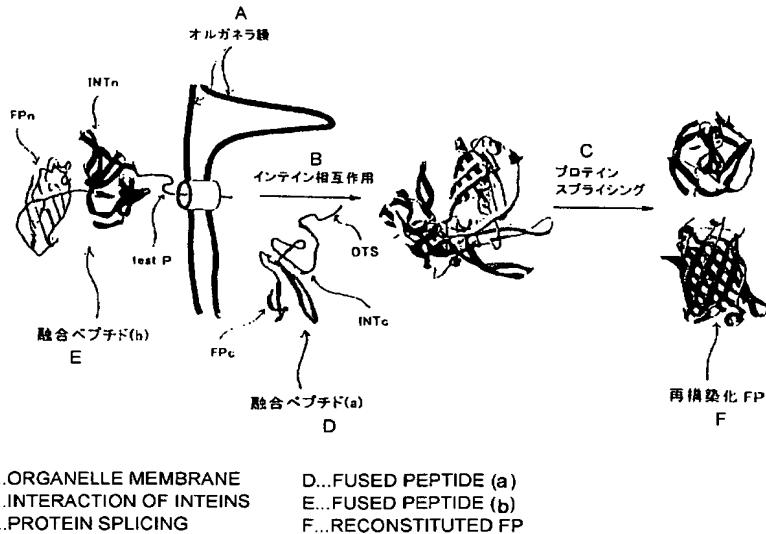
(81) 指定国(国内): CA, US.

(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(続葉有)

(54) Title: METHOD OF ANALYZING ORGANELLE-LOCALIZED PROTEIN AND MATERIALS FOR ANALYSIS

(54) 発明の名称: オルガネラ局在タンパク質の解析方法と解析材料



(57) Abstract: It is intended to provide a method of analyzing whether or not a test protein is localized in organelle characterized by comprising: (a) the step of transferring a fused peptide (a) containing a half peptide of an intein, a half peptide of a fluorescent protein and an organelle-targeting signal peptide into eucaryotic cells; (b) the step of transferring the test protein, which has been bonded to a fused peptide (b) containing the other half peptide of the above-described fluorescent protein and the other half peptide of the above-described intein, into eucaryotic cells; and (c) the step of detecting a fluorescent signal generated from the fluorescent protein, and materials (for example, the fused peptides and/or expression vectors thereof) to be used in this method.

(57) 要約: 試験タンパク質がオルガネラに局在するか否かを解析する方法であって、(a)インテインの一方のハーフペプチド、蛍光タンパク質の一方のハーフペプチドおよびオルガネラ標的シグナルペプチドを含む融合ペプチド(a)を真核細胞内に導入するステップ;(b)前記蛍光タンパク質の他方のハーフペプチドおよび前記

(続葉有)

WO 2004/027057 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

インテインの他方のハーフペプチドを含む融合ペプチド(b)に結合した試験タンパク質を真核細胞内に導入するステップ;および(c)前記蛍光タンパク質の発する蛍光信号を検出するステップ、を含むことを特徴とするオルガネラ局在タンパク質の解析方法と、この方法に使用する融合ペプチドおよび/またはその発現ベクター等の材料を提供する。

明細書

オルガネラ局在タンパク質の解析方法と解析材料

5 技術分野

この出願の発明は、オルガネラ局在タンパク質の解析方法と解析用材料に関するものである。さらに詳しくは、真核細胞の各種オルガネラに局在するタンパク質を簡便かつ正確に解析する方法と、この方法に用いる材料に関するものである。

10

背景技術

真核細胞、特に哺乳類細胞における最もはっきりした特徴の一つは、各タンパク質が個々のオルガネラ（細胞小器官）に局在しているということである。このタンパク質局在化はタンパク質の機能に密接な関連があり、そのため、あるタンパク質の局在化が機能を決定するための重要な指標となる場合も多い。従って、タンパク質の細胞内局在を解析することによって、そのタンパク質の機能が特定され、さらには新しい生物学的意義が見出される可能性がある。

20 オルガネラ局在化タンパク質を解析するための従来技術としては以下が知られている。

(i) 細胞分画技術と二次元電気泳動／質量分析法からなる方法（非特許文献1）。この方法は、細胞を個々のオルガネラごとに分画し、それぞれで発現しているタンパク質を二次元電気泳動して比較し、器官特異的なタンパク質の質量分析結果からそのタンパク質を同定する方法であり、タンパク質の系統的な解析に役

立つ。しかしながら、この従来技術 (i) は細胞内オルガネラの個々の収率と濃度に完全に依存しており、さらに重要な点としては、分画精製の難しいオルガネラには用いることができない。

(ii) 発現クローニング（非特許文献 2、3）。この方法は、
5 細胞核内で発現が活性化するレポーター分子を組み込んだ細胞内に転写因子を連結した試験タンパク質を導入し、レポーター分子の信号を検出する方法である。試験タンパク質に機能的な核局在シグナルが含まれている場合には試験タンパク質および転写因子が細胞核内に移行し、レポーター分子の信号を検出することができる。
10 しかしながら、この従来技術 (ii) はレポーター分子の発現が核内転写因子に依存しているため、核以外の器官には適用できない。

(iii) 視覚的スクリーニング（非特許文献 4 – 6）。この方法は、信号を発する蛍光タンパク質と試験タンパク質との融合タンパク質を高等真核細胞内で発現させ、蛍光タンパク質の蛍光信号を顕微鏡により観察することによって試験タンパク質の細胞内局在を調べる方法である。この従来技術 (iii) は様々なオルガネラ局在化タンパク質を同定するための強力なツールであるが、蛍光顕微鏡下で蛍光タンパク質の細胞内局在を分析および同定するためには多大な労力と時間を必要とする。
15
20

一方、この出願の発明者等は、タンパク質スプライシングの原理（非特許文献 7、8）を用いて 2 種類のタンパク質の相互作用（タンパク質 – タンパク質相互作用）を解析する方法とそのためのプローブを発明し、すでに特許出願している（特許文献 1）。

25 国際公開 WO02/08766 号パンフレット

Lopez, M. F. and Melov, S., Circ. Res. 2002, 90,

380-389

Ueki, N. et al., *Nature Biotechnol.* 1998, 16, 1338-1342

Rhee, Y. et al., *Nature Biotechnol.* 2002, 18, 433-5 437

Bejarano, L. A. and Gonzacz, C. J., *Cell Sci.* 1999, 112,

4207-4211

Misawa, K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 10 92,

9146-9150

Simpson, J. C. et al., *EMBO Report* 2000, 3, 287-292

Gimble, F. S., *Sci. Biol.* 1998, 5, R251-256

Ozawa, T. et al., *Anal. Chem.* 2001, 73, 5866-5874

15 前記のとおり、オルガネラ局在化タンパク質の解析のための従来技術 (i) ~ (iii) は、解析対象となるオルガネラの種類が限定されることや、その解析に多大な労力や時間を必要とするなどの問題点を有している。このため、特に大規模な cDNA ライブライリーを対象とする広範囲はスクリーニング（ハイスループットスクリーニング）には全く適さない方法であった。

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、あらゆるオルガネラを対象として、簡便かつ正確にタンパク質局在を解析することのできる新しい方法と、この方法に使用する解析用材料を提供することを課題としている。

25

発明の開示

この出願は、前記の課題を解決するものとして、以下の(1)～(14)の発明を提供する。

(1) 試験タンパク質がオルガネラに局在するか否かを解析する方法であって、以下のステップ：

5 (a) インティンの一方のハーフペプチド、蛍光タンパク質の一方のハーフペプチドおよびオルガネラ標的シグナルペプチドを含む融合ペプチド(a)を真核細胞内に導入するステップ；

10 (b) 前記蛍光タンパク質の他方のハーフペプチドおよび前記インティンの他方のハーフペプチドを含む融合ペプチド(b)に結合した試験タンパク質を真核細胞内に導入するステップ；および

15 (c) 前記蛍光タンパク質の発する蛍光信号を検出するステップ、を含むことを特徴とするオルガネラ局在タンパク質の解析方法。

(2) ステップ(a)において、信号特性の異なる蛍光タンパク質のそれぞれ一方のハーフペプチドと、異なるオルガネラ標的シグナルペプチドとを含む2種以上の融合ペプチド(a)を真核細胞内に導入し、ステップ(b)において、前記蛍光タンパク質のそれぞれ他方のハーフペプチドを含む2種以上の融合ペプチド(b)のそれぞれに結合した試験タンパク質を真核細胞内に導入し、ステップ(c)において蛍光信号の特性を検出する前記発明(1)の解析方法。

(3) ステップ(a)において、融合ペプチド(a)を発現する組換えベクター(A)を真核細胞にトランスフェクションすることによって融合ペプチド(a)を真核細胞内に導入する前記発明(1)または(2)の解析方法。

25 (4) ステップ(b)において、融合ペプチド(b)と試験タンパク質とを一体として発現する組換えベクター(B)を真核細胞にトラン

ンスフェクションすることによって試験タンパク質および融合ペプチド (b) を真核細胞に導入する前記発明 (1) または (2) の解析方法。

(5) インティインのハーフペプチド、蛍光タンパク質のハーフペプチドおよびオルガネラ標的シグナルペプチドを含む融合ペプチド (a)。

(6) 蛍光タンパク質のハーフペプチドおよびインティインのハーフペプチドを含む融合ペプチド (b)。

(7) インティインのハーフペプチド、蛍光タンパク質のハーフペプチドおよびオルガネラ標的シグナルペプチドを含む融合ペプチド (a) を発現する組換えベクター (A)。

(8) 蛍光タンパク質のハーフペプチドおよびインティインのハーフペプチドを含む融合ペプチド (b) と、任意の試験タンパク質とを一体として発現する組換えベクター (B)。

(9) 前記発明 (5) の融合ペプチド (a) または前記発明 (7) の組換えベクター (A) と、前記発明 (6) の融合ペプチド (b) または前記発明 (8) の組換えベクター (B) とを含むことを特徴とするオルガネラ局在タンパク質の解析用プローブセット。

(10) 融合ペプチド (a) または組換えベクター (A) が発現する融合タンパク質 (a) が、信号特性の異なる蛍光タンパク質のそれぞれ一方のハーフペプチドと、異なるオルガネラ標的シグナルペプチドとを含む 2 種以上であり、融合ペプチド (b) が、前記蛍光タンパク質のそれぞれ他方のハーフペプチドを含む 2 種以上である前記発明 (9) のプローブセット。

(11) インティインのハーフペプチド、蛍光タンパク質のハーフペプチドおよびオルガネラ標的シグナルペプチドを含む融合ペプ

チド (a) を保有する真核細胞。

(12) 前記発明 (11) の真核細胞を 2 以上有する細胞キット。

(13) 信号特性の異なる蛍光タンパク質のそれぞれ一方のハーフペプチドと、異なるオルガネラ標的シグナルペプチドとを含む
5 2 種以上の融合ペプチド (a) を保有する真核細胞。

(14) 前記発明 (13) の真核細胞を 2 以上有する細胞キット。

すなわち、前記発明 (1) ~ (4) の解析方法は、インテイン
(intein) のタンパク質スプライシング (非特許文献 7、8)
による蛍光タンパク質の再構築を基礎としており、前記発明 (5)
10 ~ (14) の各種材料を用いて実施することができる。

なお、この出願の発明において、「タンパク質」および「ペプチド」とは、細胞から単離精製されたもの、遺伝子工学的に製造されたもの、合成されたもの、またはそれらと構造的に類似の生物活性等価物であって、ペプチド結合として知られるアミド型の連結により連なっているアミノ酸のポリマーを意味するのに使用する。

「試験タンパク質」は、生物細胞 (特に真核細胞) において発現する機能既知または機能未知のタンパク質であり、特にオルガネラの局在が不明のタンパク質である。アミノ酸配列構造が既知
20 であるものが好ましく、そのアミノ酸配列をコードする塩基配列が既知であるものがさらに好ましい。この試験タンパク質は、例えば公知のタンパク質ライブラリーから選択して用いることができ、あるいは cDNA ライブラリー (既存ライブラリー、または任意細胞のトータル RNA から調製した cDNA ライブラリー) の各
25 cDNA クローンから遺伝子工学的に作製したタンパク質を用いることができる。

「真核細胞」は、酵母細胞、昆虫細胞、動物細胞等であり、特にヒトを含めた哺乳動物細胞である。

「オルガネラ」は、真核細胞膜の内部に存在し、細胞の各種機能を分業している構造単位であって、例えば細胞核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、分泌顆粒、分泌小胞、リソソーム、ファゴソーム、エンドソーム、ペルオキソームなどを包含する。

「オルガネラ標的シグナルペプチド」とは、各オルガネラに特異的に局在化するタンパク質の全長、またはそれら局在化タンパク質に存在してそれぞれの局在化のために働く移行シグナル（または局在化シグナル）ペプチドであり、公知のものを使用することができる。例えば、核標的シグナルペプチドとしては核内タンパク質（例えばヒストンやウイルス性タンパク質等）またはその部分シグナルペプチドを適宜に使用することができる。また、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、ペルオキソーム等のオルガネラの場合には、細胞分画法等において各オルガネラの標識酵素として使用される酵素（例えば、ミトコンドリアではシトクロムcオキシダーゼ、小胞体ではグルコース-6-ホスファターゼ、ゴルジ体ではガラクトシルトランスフェラーゼ、ペルオキソームではカタラーゼなど）またはそのシグナルペプチドを使用することができる。これらのオルガネラ標的ペプチドは、公知のタンパク質データベース（例えば、URL：[HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez"](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>）等からアミン酸配列やそれをコードするポリヌクレオチドの塩基配列情報を得ることができる。

「インティン」は、翻訳後のタンパク質からスプライシングに

よって切り出される内部タンパク質セグメントであり、各種生物由来の野性型インティンおよびタンパク質スプライシングに関する「機能的部分」であってもよい。インティンとしては、具体的には、例えば酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、カンジダ菌 5 *Candida tropiallis* または古細菌 *Thermoplasma acidophilum* 等に由来の VMA、結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* 由来の RecA および pps1、藍藻類 *Synechocystis* 由来の DnaB および DnaE 等を使用することができるが、これらに限定されるものではない。使用可能なインティンの種類やアミノ酸配列および塩基配列は 10 InBase: the Intein Database (Nucleic Acids Res. 2002, 30 (1), 383-384; URL: HYPERLINK "<http://www.neb.com/neb/inteins.html>" <http://www.neb.com/neb/inteins.html>") から詳しく知ることが出来る。

「蛍光タンパク質」とは、励起光を照射すると蛍光を発するタンパク質またはその機能的部分であり、例えば、発光クラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 (GFP) や、その変異体である EGFP、EYFP (黄色蛍光)、ECFP (青色蛍光)、DsRed1 や DsRed2 (赤色蛍光)、ウミシイタケ由来の緑色蛍光タンパク質 hrGFP などが例示できる。これらの蛍光タンパク質のアミノ酸配列やそれをコードする塩基配列についても、公知のタンパク質データベース (例えば 15 、 URL : HYPERLINK "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>" <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>") 等から情報を得ることができる。

「ハーフペプチド」とは、前記のインティンおよび蛍光タンパク質のそれぞれの C 端側および N 端側アミノ酸配列を有するペプチドであり、C 端側ハーフペプチドと N 端側ハーフペプチドが一 20

体化するとインティンおよび蛍光タンパク質の全長タンパク質または全長タンパク質の機能性部分となる。一方のハーフペプチドが C 端側の場合には、他方のハーフペプチドは N 端側であり、一方が N 端側の場合、他方は C 端側である。また「ハーフ」は必ずしも半分を意味する訳でなく、ある特定のアミド結合を切断することにより、タンパク質の機能的部分を二分することを意味する。

「融合ペプチド」とは、前記の各ハーフペプチドや標的シグナルペプチドが縦列一体化したペプチドであり、各ペプチドの C 端と N 端がペプチド結合によって連結されたものである。また各ペプチドが「リンカーペプチド」によって連結されたものであってもよい。例えば、前記のインティン VDE では、エンドヌクレアーゼドメインを削除し、屈曲性のドテカペプチドリンカーで置き換えた変異体が高いスプライシング活性を示すことが知られている (Cooper, A. A., Chen, Y. J., Lindorfer, M. A., and Stevens, T. H., EMBO J., 12, 2575-2583, 1993; Chong, S. and Xu, M.-Q., J. Biol. Chem., 272, 15587-15590, 1997)。

この発明において使用するその他の用語や概念については、発明の実施形態や実施例の記載において説明する。また、この発明を実施するために使用する様々な遺伝子操作技術等は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献 (例えば、Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989) 等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能なものである。

以下、前記の各発明の実施形態を詳しく説明する。

図面の簡単な説明

図 1 は、この発明方法の基本的原理を示した模式図である。

図 2 は、実施例で作製した融合ペプチド (b) および (a) の構造と、タンパク質スプライシング後に再構築される EGFP の構造を示した模式図である。塩基配列およびアミノ酸配列は、DnaEn と EGFPn、DnaEc と EGFPc、EGFPn と EGFPc の間のリンカーペプチド配列である。

図 3 は、実施例での解析プロセスの模式図である。

図 4 は、実施例で作製した組換えベクターの構造を示した模式図である。LTR は末端反復配列、 ψ はレトロウイルスパッケージングシグナル、IRES は内部リボソーム導入部位、NEO はネオマシン耐性遺伝子を示す。

図 5 は、カルモジュリン (CaM) または MTS を連結した EGFPn-DnaEn を発現している BNL1MEmito 細胞の全細胞溶解物のウエスタンブロッティング分析の結果である。EGFPc に特異的なモノクローナル抗体を用いて行った。

図 6 は、MTS-EGFPn-DnaEn 融合ペプチドが発現し、ミトコンドリアに局在化していることを示す顕微鏡写真である。MOI 値 5 で pMX-Mito/LIB-MTS に感染させた BNL1MEmito 細胞を 2 日間培養し、細胞をガラス底シャーレに蒔いた。生細胞の造影を行い (a ; 透過型) 、EGFP の蛍光の記録を共焦点顕微鏡により行った (b)。映像の撮影後、テトラメチルローダミンエチルエステルを用いて生細胞内のミトコンドリアを染色した (c)。(d) は、EGFP がミトコンドリアに特異的に局在していることを示すスーパーインポーズ画像である。

図 7 は、再構築された EGFP を内包する BNL1MEmito 細胞の

FACS プロフィールである。左グラフ (A) は、BNL1ME_{mito} 細胞に對して、CaM-EGFPn-DnaEn を発現しているレトロウイルスを MOI 値 5 で、MTS-EGFPn-DnaEn を発現しているものを MOI 値 5 または MOI 値 0.2 で、それぞれ感染させた。コントロールとして未感染 5 細胞を用いた。右グラフ (B) は、対照としてのレトロウイルス感染を測定した結果である。レトロウイルス感染の単回ヒット動態が、L 領域の EGFP 陽性細胞の比率に対する MOI の相関により示されている。全てのデータ点は 10,000 個の測定細胞から取得し、測定は 3 回繰り返した。挿入図は一次相関範囲の拡大グラフである。 10

図 8 は、FACS により蛍光細胞を選別した結果である。 (A) は BNL1ME 細胞に感染効率 20% で cDNA レトロウイルスライブラリーを感染させ、5 日間のインキュベーション後、細胞を剥離させ、FACS によりソートした結果である。未感染細胞を挿入し、バッ 15 クグラウンド蛍光を示した。 (B) は、(A) の L 領域付近の拡大 FACS プロフィールである。

図 9 は、代表的なクローン細胞のフローサイトメトープロフィールと蛍光画像である。左グラフは、クローンされた細胞と未感染 BNL1ME_{mito} 細胞の蛍光強度をフローサイトメトリーにより 20 測定した結果である。分析対象となる全細胞数は 10^5 個である。右蛍光画像は、各クローン細胞をガラススライド上で培養し、再構築された EGFP を内包する生細胞の共焦点画像を撮影した結果である。TMRE を用いて細胞染色を行い、個々の細胞のミトコンドリアの局在を示した。積層共焦点画像により、EGFP の再構築 25 がミトコンドリア内で生じていることが示された。

発明を実施するための最良の形態

発明(1)は、以下のステップを行うことによって、試験タンパク質が任意のオルガネラに局在するか否かを解析する方法である。

ステップ(a)：インテインの一方のハーフペプチド、蛍光タンパク質の一方のハーフペプチドおよびオルガネラ標的シグナルペプチドを含む融合ペプチド(a)を真核細胞内に導入する。

ステップ(b)：前記蛍光タンパク質の他方のハーフペプチドおよび前記インテインの他方のハーフペプチドを含む融合ペプチド(b)に結合した試験タンパク質を真核細胞内に導入する。

ステップ(c)：前記蛍光タンパク質の発する蛍光信号を検出する。

この発明(1)の方法は、この発明によって提供される融合ペプチド(a)（発明(5)）と融合ペプチド(b)（発明(6)）を用いて実施することができる。それぞれの融合ペプチドに使用するインテインのハーフペプチドおよび蛍光タンパク質のハーフペプチドは、同一のインテインおよび蛍光タンパク質からそれぞれ調製する。

また、それぞれのハーフペプチドはC端側同士、N端側同士を連結する。融合ペプチド(a)がC端側ハーフペプチド同士の組み合わせの場合には、融合ペプチド(b)はN端側ハーフペプチド同士とし、その逆であってもよい。ただし、インテインのN端側ハーフペプチドとC端側ハーフペプチドがオルガネラ内で連結してスプライシング活性を持つように、蛍光タンパク質のN端側ハーフペプチド(FPn)およびインテインのN端側ハーフペプチド(INTn)の組み合わせ(N-FPn/INTn-C)、インテインのC端側ハーフペプチド(INTc)および蛍光タンパク質のC端側ハーフペプチド(FPc)の組み合わせ(N-INTc/FPc-C)とする。以下で

は、融合ペプチド(a)がN-INTc/FPc-Cであり、融合ペプチド(b)がN-FPn/INTn-Cである場合を例として説明する。

融合ペプチド(a)におけるオルガネラ標的シグナルペプチド(OTS)は、N-INTc/FPc-CのC端側に連結してもよく(N-OTS/INTc/FPc-C)、N端側に連結してもよい(N-INTc/FPc/OTS-C)。また、融合ペプチド(b)に連結する試験タンパク質(testP)も、そのいずれの側に位置してもよい(N-testP/FPn/INTn-CまたはN-FPn/INTn/testP-C)。

融合ペプチド(a)、および融合ペプチド(b)/testPは、それぞれのペプチド/タンパク質を公知の方法によってペプチド結合させて作製することができる。また、公知の固相合成法等によって化学合成して作製することもできる。あるいは、それぞれのペプチドをコードするポリヌクレオチドを連結して融合ポリヌクレオチドを作製し、*in vitro* 転写翻訳系や適当な宿主ベクター系で発現させることによっても作製することができる。

例えば融合ペプチドを*in vitro* 転写翻訳で作製する場合には、前記の融合ポリヌクレオチドを、RNAポリメラーゼプロモーターを有するベクターに挿入して発現ベクターを作製し、このベクターを、プロモーターに対応するRNAポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加する。RNAポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6などが例示できる。これらのRNAポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript IIなどが例示できる。

融合ペプチドを、大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合

部位、DNA クローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに前記の DNA 断片を組換えた発現ベクターを作成し、培養物から融合ペプチドを単離する。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC 系、pBluescript II、pET 発現システム、pGEX 発現システムなどが例示できる。
5

また融合ペプチドを真核細胞で発現させる場合には、前記の融合ポリヌクレオチドを、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに挿入して組換えベクターを作成し、真核細胞内に導入すれば、融合ペプチドを形質転換真核細胞で発現させることができる。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBV ベクター、pRS、pcDNA3、pMSG、pYES2 などが例示できる。

真核細胞としては、サル腎臓細胞 COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO などの哺乳動物培養細胞、出芽酵母、分裂酵母、15 カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが一般に用いられるが、目的とする融合ペプチドを発現できるものであれば、いかなる真核細胞でもよい。発現ベクターを真核細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAE デキストラン法など公知の方法を用いることができる。

融合ペプチドを原核細胞や真核細胞で発現させたのち、培養物から目的ペプチドを単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせて行うことができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー

一などが挙げられる。

ステップ (a) および (b) において、融合ペプチド (a) および融合ペプチド (b) / testP を細胞内に導入するには、例えば、脂質 (BioPORTER (Gene Therapy Systems 社、米国) 、 Chariot (Active Motif 社、米国) 等) を用いた細胞内導入法を採用することができる。また、細胞膜通過ペプチドである HIV-1・TAT の PTD (protein transduction domain) や、ショウジョウバエのホメオボックスタンパク質アンテナペディアの PTD を前記の融合ペプチドに連結させることによって、融合ペプチドを細胞内に導入することもできる。

あるいはまた、この発明によって提供される組換えベクター (A) (発明 (7)) および組換えベクター (B) (発明 (8)) を用いる方法 (発明 (3)、(4)) によっても目的の融合ペプチドを細胞内に導入することができる。この発明 (7) および (8) の方法は、融合ペプチドの細胞内導入をより簡便かつ確実に行うことができるという点において好ましい方法である。組換えベクター (A) および (B) は、融合ペプチドの遺伝子工学的作製について説明した真核細胞発現用ベクターと融合ポリヌクレオチドを用いて作製することができる。これらの組換えベクターを真核細胞内に前記の公知方法によって導入すれば、融合ポリヌクレオチドがコードする融合ペプチドを細胞内で発現させることができる。

ステップ (a) において、以上の方法により細胞内に導入された融合ペプチド (a) は、その OTS によって指定のオルガネラ内に移行する (図 1)。また、ステップ (b) において細胞内に導入された融合ペプチド (b) / testP は、その testP が指定のオルガネラ局在性を有している場合には、そのオルガネラ内に移行し、そ

こに存在する融合ペプチド (a) と相互作用し、会合した INTn と INTc がタンパク質スプライシングによって切り出され、FPn と FPC が再構築されて蛍光信号を発する（図 1）。

従って、ステップ (c) において細胞の蛍光信号を検出することによって、testP が指定のオルガネラ局在性を有しているか否かを判定することができる。蛍光信号の検出は、細胞を蛍光顕微鏡で観察することによって行うことができる。あるいは、蛍光活性化セルソーティング（fluorescence-activated cell sorting : FACS）法によって蛍光信号を発する細胞を選択するようにしてよい。この FACS を用いる方法は、その簡便性によって、例えば大規模なタンパク質ライブラリーや cDNA ライブラリーを対象とする広範囲なスクリーニング（ハイスループットスクリーニング）を可能とするために、好ましい方法である。

この出願の発明 (2) は、前記発明 (1) の別形態の解析方法である。すなわち、この発明 (2) の方法では、ステップ (a) において、一つの細胞の異なる 2 以上のオルガネラにそれぞれ融合ペプチド (a) を導入する。それぞれの融合ペプチド (a) は、オルガネラ標的シグナルペプチドがそれぞれ異なるオルガネラを標的とするペプチドであり、蛍光タンパク質がそれぞれ異なる特性（色調等）を有している。例えば、ミトコンドリアには緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 、小胞体には黄色蛍光タンパク質 (EYFP) 、ゴルジ体には青色蛍光タンパク質 (ECFP) のそれぞれのハーフペプチドを有する融合ペプチド (a) を存在させる。そして、ステップ (b) において、前記各蛍光タンパク質の他方のハーフペプチドを有する融合ペプチド (b) に試験タンパク質を結合させて細胞内に導入し、細胞が発する蛍光

信号の色調（緑、黄、青）または色調変化に対応する吸光度を検出すれば、試験タンパク質がミトコンドリア、小胞体およびゴルジ体のいずれに局在性を有するかを判定することができる。

なお、この発明(1)および(2)は、この出願によって提供されるプロープセット（発明(9)、(10)）を用いることによって効率よく実施することができる。さらには、この出願によって提供される細胞（発明(11)および(13)）を用いることによって、それぞれのステップ(a)を省略することができる。また、これらの細胞は、それぞれ2以上の中の細胞集団からなる細胞キット（発明(12)および(14)）とすることもできる。この発明(12)の細胞キットは、全ての細胞が同一オルガネラに融合ペプチド(a)を備えている複数個の細胞集団であってもよく、あるいはそれぞれに異なるオルガネラに融合ペプチド(a)を備えている複数個の細胞集団であってもよい。また、発明(14)の細胞キットでは、全ての細胞が2種以上の同一オルガネラにそれぞれ融合ペプチド(a)を備えている複数個の細胞集団であってもよく、あるいはそれぞれに2種以上の異なるオルガネラに融合ペプチド(a)を備えている複数個の細胞集団であってもよい。なお、この細胞キットでは、細胞が浮遊細胞の場合には適当な液体培地中に各細胞を浮遊させた状態とすることもできる。接着性の細胞の場合には、いわゆる「細胞チップ」の形態とすることもできる。さらには、これらの細胞キットを構成する細胞は同一種の細胞であってもよく、あるいは異なる細胞であってもよい。例えば、正常細胞と疾患細胞（例えば癌細胞など）とを組み合わせて細胞キットを構成することもできる。

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ

具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

実施例

5 1. 方法

1. 1 発現ベクターの作成

アミノ酸 1-157 を強化した EGFP cDNA をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により増幅し、Lys-Phe-Ala-Glu-Tyr-Cys (配列番号 1) を spEGFP の C 端に導入した。この cDNA を DnaE インテインの N 端スプライシングドメインの cDNA に融合させ、原核ベクター Bluescript 中でサブクローニングした。PCR 産物をシーケンス解析して塩基配列を確認し、pMX ベクター内の SalI 制限部位にサブクローニングした。ミトコンドリア標的シグナルペプチド (MTS) またはカルモジュリンと結合した EGFPN 端側ハーフペプチド (EGFPn) と DnaE の N 端側ハーフペプチド (DnaEn) からなる融合ペプチド (b) を作成するため、PCR により cDNA を増幅し、BamHI (5') および NotI (3') 制限部位に導入した。この PCR 産物を pMX-Mito/LIB 中のフレーム内に挿入し、これらのシーケンスを検証した (図 2 参照)。

20 1. 2 安定クローンの選別

MTS を結合した DnaE の C 端側ハーフペプチド (DnaEc) の cDNA を PCR により増幅した。EGFP の 158-238 に対応するカルボキシル末端の半分の cDNA を、Cys-Phe-Asn-Lys-Ser-His (配列番号 2) のペプチドをアミノ末端に伸張しつつ、PCR により増幅した。これら 2 つの PCR 産物を MunI 部位で結合させて融合ペプチド (a) を作製し、pBluescript 中でサブクローニングを行った

(図 2 参照)。この産物をシークエンス解析して塩基配列を確認し、pMX ベクター内の BamHI (5') および SalI (3') 制限部位に導入した。DH5 α' 大腸菌中で増幅した後、融合遺伝子を Lipofectamine Plus (Invitrogen) を用いて PlatE 細胞内にトランスフェクションした。2 日培養後、高力価のレトロウイルスを収集し、BNL1ME 細胞内にトランスフェクションした。成長因子を含む G418 (Invitrogen 社) 中での約 10 日間にわたる選択培養後に、安定した発現細胞を取得した (図 3 参照)。

1. 3 cDNA ライブラリーの構築

10 1×10^8 BNL1ME 細胞からの Poly(A)+RNA の精製は、FastTrack キット (Invitrogen 社) を用いて行った。ランダムヘキサマーを用いた poly(A)+ RNA からの cDNA の合成は、cDNA 合成キット (Invitrogen 社) を用いて行った。結果的に得られた cDNA に対して、カラムクロマトグラフィーとアガロースゲル電気泳動によりサイズ分画を行い、Qiaex II キット (Qiagen 社) を用いて 600 kbp 以上の長さの cDNA フラグメントをアガロースゲルから抽出した。pMX-Mito/LiB の BstXI 部位への cDNA 断片の挿入は、BstXI アダプター (Invitrogen 社) を用いて行った。結合 DNA をエタノール沈殿し、その後 DH10B- コンピテント細胞 (Invitrogen 社) 中にトランスフェクションした。プラスミド DNA の精製は Qiaex (Qiagen 社) を用いて、16 時間にわたる 200 mL の培養後に行った。パッケージ細胞株である PlatE へのプラスミドのトランスフェクションは、Lipofectamine Plus (Invitrogen 社) を用いて行った。2 日間の培養後、高力価のレトロウイルスが収集された (図 3 参照)。

1. 4 ソーティング戦略

サブコンフルーエント (70%) な BNL1ME 細胞レイヤーを、構築したレトロウイルスライプラリーに、感染効率が 20%以下となるように感染させた。感染効率の評価は pMX-EGFP を用いた対象実験により行った。細胞は感染の 48 時間後に分離し、直径 6cm の 5 シャーレ 4 枚に展開した。72 時間のインキュベーション後、トリプシン-EDTA を用いて細胞をはがし、PBS 緩衝液 (Gibco BRL) 中に溶解した。FACS 分析の実施は ALTRA フローサイトメーター (Beckmann Coulter 社) 上で行い、これにより GFP-陽性単一細胞をソーティングした。これらの細胞は 96 ウエルのプレートでインキュベートするか、直径 10cm のシャーレに蒔き、その後チップを用いてサブクローニングを行った (図 3 参照)。

1. 5 組み込み cDNA の同定

BNL1ME クローンから抽出したゲノム cDNA をネステッド PCR 法により増幅し、組み込まれた cDNA を回収した。プライマーは、 15 5'-AGGACCTTACACAGTCCTGCTGACC-3' (配列番号 3) および 5'-GCCCTCGCCGGACACGCTGAACTTG-3' (配列番号 4) のセットと、 5'-CCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGC-3' (配列番号 5) および 5'-CGCCGTCCAGCTCGACCAGGAT-3' (配列番号 6) のセットを用いた。 PCR は LA Taq ポリメラーゼ (Takara Shuzo 社) を用いて 30 サイクル行った (98°C 30 秒で変性、 58°C 30 秒でアニーリング、 72°C 2 分で伸張)。結果として得られた二次 PCR フラグメントのシーケンス解析を、 BigDyeTerminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社) を用いて行い、分析を自動シーケンサ (310 Genetic Analyzer; Applied Biosystems 社) により行った (図 3 参照)。

1. 6 遺伝子配列および遺伝子の機能的解析

それぞれの cDNA シーケンス比較は、GenBank、PDB、SwissProt、PIR、PRF を含むデータベース中の cDNA シーケンスにより、BLASTn を用いて行った。cDNA 鎮の方向の同定は RIKEN クローンセットにより行ったが、これらはいくつかの段階に分類されており、それらの機能は解析されている。相同性分析の実施は Blast プログラムを用いて行った。

1. 7 蛍光信号の画像化

BNL1ME クローンをガラス製シャーレ上に蒔き、生育培地の存在下で 24 時間にわたりインキュベーションを行った。培地を 5% FCS 添加 PBS 溶液に置換し、共焦点レーザースキャニング顕微鏡 (Carl Zeiss 社) を使用して生細胞の直接映像撮影を行った。映像撮影後にミトコンドリアの染色をテトラメチルローダミンエチルエステル (TMRE; Molecular Probes 社) を用いて行った。PBS 緩衝液中の TMRE の最終濃度は $1 \mu M$ に調節した。インキュベーション時間は 10 分であった。細胞は 543nm の波長で照射し、560nm LP フィルターを用いて映像を撮影した。

2. 結果

2. 1 ミトコンドリアタンパク質の選択的および高感度検出

このライプラリースクリーニングを正確に行うためには、以下の 2 点の要件を満たす必要がある。1) ミトコンドリア内で再構成される EGFP の蛍光強度が、FACS 分析による検出を受けるに足りるだけ高感度かつ強力であること。2) MTS 存在下でタンパク質を含む細胞を、MTS の存在しない細胞から選択的に分離して収集することができる。この選択性および高感度検出を検査するため、細胞内局在について十分に特徴が分かっているタンパク質の試験を、マウス肝細胞 (BNL1ME) 内部で行った。EGFP

および DnaEc の C 端側ハーフペプチドに対応する cDNA と、チトクローム C オキシダーゼ VIII サブユニットの前駆物質に対応するミトコンドリアの標的シグナルをコードする pMX-MTS/DEC (Neo) プラスミドを構築した（図 4）。スプライシング 5 部分ではさらに 5 個のアミノ酸をコードする cDNA をインサートし、効率的なスプライシングが生じるようにした（図 2）（Evans, J. et al., J. Biol. Chem. 2000, 275, 9091-9094）。このプラスミドをレトロウイルスに変換し、これらを BNL1ME 細胞に感染させ、それぞれの試験タンパク質をミトコンドリア内で 10 発現する安定細胞株を開発した（BNL1MEmito）。試験タンパク質として、既知の細胞質タンパク質であるカルモジュリン、またはシグナルペプチドである MTS を用いた。これらの cDNA は EGFPn および DnaEn をコードする cDNA と連結し、それらの融合ペプチドを BNL1MEmito 細胞内で発現させた（図 4）。細胞のウ 15 エスタンプロットにより、タンパク質スプライシングが生じて未変化 EGFP が産生されたことが確認されたが、この産生物は野生型 EGFP よりわずかに分子量が多く、スプライシング部分における 10 個のアミノ酸の添加を反映している（図 5）。タンパク質スプライシングがミトコンドリア内で生じていることを確認する 20 ため、BNL1MEmito 生細胞の蛍光イメージを調べた。EGFP の局在は、細胞透過性のあるミトコンドリア選択的色素であるテトラメチルローダミンのエチルエステルにより染色したミトコンドリアの場合と、実質的に同じであることが確認された（図 6）。しかも、タンパク質スプライシング後の EGFP 形成が、N 端側に MTS 25 を連結した融合ペプチドに特異的に生じていることも確認された。

再構築された EGFP の蛍光強度がセルソーターによる蛍光細胞

の単離に足りるほど強力であることを確認するため、ここではさまざまな感染多重度 (MOI、細胞あたりの cDNA 数により定義される) で、MTS-EGFPn-DnaEn を產生するレトロウイルスを BNL1MEmito 細胞に感染させた。MOI の調節は特に重要であるが、
5 これは BNL1MEmito 細胞中で cDNA の多重集積が生じた結果、セルソーティング後に擬陽性の cDNA が単離される可能性があるためである。このため、感染効率を 1 細胞 1 遺伝子として調節することが必要であった。そのため、様々な MOI を用いた感染の 48 時間後に、再構成された EGFP を含む細胞数の評価をフローサイ
10 トメトリーにより行った。MOI が 5 の場合には、全ての細胞が強い蛍光を示した (図 7)。MOI が 0.01 の場合には $1.6 \pm 0.1\%$ 、MOI が 0.02 の場合には $3.6 \pm 0.3\%$ 、MOI が 0.06 の場合には $9.4 \pm 0.6\%$ 、MOI が 0.1 の場合には $15.4 \pm 1.1\%$ 、MOI が 0.2 の場合には $36.7 \pm 1.4\%$ 、MOI が 0.5 の場合には $60.5 \pm 1.3\%$ 、そして
15 MOI が 1.0 の場合には $71.1 \pm 1.0\%$ の細胞が蛍光を示した。0 から 0.2 の MOI 範囲では、蛍光細胞は MOI の増加に比例して増加しており、0 から 0.2 の MOI 範囲では感染は細胞あたり 1 個の cDNA として生じていることが示された。この単回ヒット感染での EGFP の蛍光強度は、MTS が存在または非存在である細胞を十分に分離するものであり、これは蛍光強度の 2 個のピーク幅が証拠となっている。これらのデータから、単一の BNL1MEmito 細胞中で再構築された EGFP 量は、ミトコンドリアタンパク質の高感度検出とセルソーターを用いた選択的単離を可能とするに十分であることが確認された。
20 2. 2 cDNA ライブラリーからのミトコンドリアタンパク質の選別

ミトコンドリアタンパク質をコードする遺伝子が、大規模 cDNA ライブライリーから選択的に単離可能であるかどうかを検討した。BNL1MEmito 細胞に由来する各 cDNA を、EGFPn および DnaEn の cDNA フラグメントの上流にある 2箇所の BstXI 部位に 5 クローニングして、cDNA-EGFPn-DnaEn 融合ライブライリーを作成した（図 3）。縦列融合フラグメントである cDNA-EGFPn-DnaEn の順序はその細胞内局在を分析するために重要であるが、これはほとんどの MTS がミトコンドリアタンパク質のアミノ末端に結合するためである（Roise, D. et al., EMBO J. 1988, 7, 649- 10 653; Von Heijne, G. EMBO J. 1986, 5, 1335-13429, 10）。このように構築された cDNA ライブライリーには 1.1×10^6 個の独立したクローンが含まれており、cDNA のサイズは平均して 1.4 kbp である。このライブライリーを高力価レトロウイルスパッケージ化細胞株である Plat-E 細胞（Morita, S. et al. Gene Therapy 15 2000, 7, 1063-1066）を用いて、レトロウイルスに変換した。

予備試験では、 1×10^7 個の細胞に $50 \mu\text{L}$ のレトロウイルス上清を感染させて、20%の感染効率を達成した。感染処理の 3 日後、 1×10^5 個の細胞の蛍光強度を FACS 分析によって測定した。感染細胞の母集団は、再構築 EGFP の存在あるいは非存在下にある、細胞の混合物により構成されている（図 8。L 領域の蛍光細胞の比率は、全細胞数の $0.089 \pm 0.008\%$ ($n=10$) であることが判明した。

次に、FACS 分析によって L 領域の蛍光細胞の母集団を収集した。1 秒あたりの分析細胞数として定義されたデータ率は $(1.0 \pm 25 0.1) \times 10^3$ になるように調整した。このデータ率の設定では 10^7 個の細胞を数時間以内に検査することが可能であった。この実験

では、 1×10^3 個の細胞が L 領域での蛍光細胞として計数されたが、細胞の半数は回収されなかった。このため、蛍光細胞の実際の収集量は 500~1000 個の細胞となり、このような FACS と組み合わせた EGFP 再構築技術によって、MTS-結合融合ペプチドを高速で

5 収集できることが示された。

またセルソーティングの精度を評価するために、ここでは各単離クローンの蛍光強度と細胞内局在の分析を行った。cDNA がホストゲノム中に組み込まれているならば、BNL1ME_{mito} 細胞内では対応するタンパク質が構成され発現している筈であり、そのため EGFP の再構築はミトコンドリア内に留まる。これを確認するため 200 個の収集されたクローンの蛍光強度を FACS により分析したが、このうち 169 個のクローンが様々な強度で蛍光を発していた（図 9）。残り 31 個のクローンは蛍光を発せず、これらの cDNA はゲノム PCR により回収されなかったことから、cDNA が核ゲノムに組み込まれなかったか、あるいは一度組み込まれたとしても細胞分裂途中に核ゲノムから脱落したことが示される。次に 100 個の蛍光細胞クローンをランダムに選択し、再構築された EGFP の細胞内局在を調べた。EGFP はミトコンドリア内に限局していることが判明し（図 9）、これらの細胞内ではミトコンドリアタンパク質をコードする cDNA がそれぞれのクローン内部に組み込まれており、cDNA シーケンスが即座に解析可能であることが示された。

2. 3 個別の cDNA クローンに対する分析

個々の cDNA の特徴を調べるために、それぞれのクローンから核ゲノムを抽出し、組み込まれた cDNA を PCR 増幅により回収し、これをシーケンス分析に供した。分析対象となった最初の 150

個のクローンのうち得られた発現シーケンスタグ (ESTs) には、1 度だけ発現したタグが 32 個、複数回同定されたタグが 28 個含まれていた。冗長ではない合計 60 個の cDNA のうち、56 個のクローンが GenBank 中で同定された。残りの 4 個の遺伝子が新しく同定され、これにはミトコンドリアの標的シグナルが含まれていた。それぞれの新規遺伝子産物のミトコンドリア内における局在は、共焦点顕微鏡によって確認された。

合計 56 個の GenBank に存在するクローンのうち、良く特徴の知られたミトコンドリアタンパク質が多数同定されたが、これら 10 は例えば Acad1、Gcdh、Cox5b、ATP シンターゼ、Ucp2、マレイン酸デヒドロゲナーゼなどである (表 1)。これらのタンパク質は全てミトコンドリア基質または内膜に存在している。特徴が不明な残りのクローンのうち、いくつかの遺伝子産物の機能については新しく次のように説明されている。

15 例えば、No. 10 クローンに由来する cDNA は公開シーケンスデータベースの DDBJ (RIKEN 全長 cDNA クローン) において同定されている (Hayashizaki, Y. et al. *Nature* 2001, 409, 685-690)。No. 10 クローンとデータベースに由来する cDNA のリーディングフレームと予想される開始コドンはいずれも完全に一致している。公開データベースを用いた相同性分析によれば、クローニングされた cDNA 断片と、*Schizosaccharomyces pombe* から誘導した推定チトクローム c オキシダーゼ組み立てタンパク質の間には、DNA レベルで 23% の相同性が存在した。このためマウスクローン No. 10 はチトクローム c オキシダーゼ組み立てタンパク質か、関連機能を持つタンパク質に属している。同様にクローン 20 No. 92 に由来する cDNA はヒトミトコンドリアの 28S リボソーム

タンパク質 (S18-1) の cDNA に対して 76%の相同意があることが判明した。このような高い相同意と、この実験で得られたミトコンドリア局在化から、クローン No. 92 の cDNA はマウスミトコンドリアのリボソームタンパク質であることが確認された。他のリボソームタンパク質である S18 (クローン No. 51) は、マウスのリボソームタンパク質であることが既に同定されているが、局在化については詳しい考察がなされていない。

MTS は 20~60 程度のアミノ酸残基により構成されており、一つの疎水性面と一つの陽性荷電面との間に両親媒性の α -らせんを形成する能力がある。アミノ末端およびミトコンドリア内のアミノ末端断片に塩基性および疎水性アミノ酸が存在しているという事実から、cDNA の転写産物はマウスのミトリボソームに特異的であることが示される。新規に注釈された他の遺伝子は、遺伝子名称と共に表 1 にまとめた。加えて表 1 に示した 3 個のクローンの cDNA は、リーディングフレームと開始コドンが RIKEN の全長 cDNA クローンに完全に一致することが分かっているが、他の真核細胞に対して著しい類似性はみられない。そのため、これらの 3 種類のクローンはミトコンドリア内に局在化する新規タンパク質であることが示される。

表 1

センス cDNA のカテゴリー	クローン No.
マウスタンパク質と同一	
マレイン酸デヒドロゲナーゼ	11, 52, 53, 54
チトクローム c オキシダーゼ、サブユニット Vb (Cox5b)	20
ATP 合成酵素 α サブユニット	23, 27, 84, 85, 95
脱共役タンパク質 2 (Ucp2)	35
グルタル CoA デヒドロゲナーゼ (Gcdh)	40, 43, 49, 57 93
アセチル補酵素 A デヒドロゲナーゼ (Acadl)	58
チトクローム b	1
アルデヒドヒドロゲナーゼ 2	140
ATP 合成酵素 H ⁺ 輸送、ミトコンドリア F1 複合体、 ガムマホリベーフチト	143
ミトコンドリアリボソームタンパク質 SII	147
マウス遺伝子に類似	
ホスホエノールビルビン酸カルボキシキナーゼ 2	71, 100
60S リボソームタンパク質 L3 (L4)	108
NADH-ユビキノンオキシダーゼ、13kDa-A サブユニット 無機ホスファターゼ	144, 150 148
哺乳類遺伝子と相同	
推定チトクローム c オキシダーゼ組み立てタンパク質 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 、23%)	10, 94
熱ショックタンパク質 75 (ヒト、89%)	46, 70, 77
リボソームタンパク質 S18 (Rsp18) (ヒト、76%)	51, 63
膜結合タンパク質 SLP-2 (ヒト、93%)	87
ミトコンドリア 28S リボソームタンパク質 S18-1 (ヒト、 77%)	92
NADH-ユビキノンオキシダーゼ、30kDa サブユニット前 駆物質 (ヒト、88%)	99
コハク酸デヒドロゲナーゼ複合体、サブユニット B、鉄 含有 (ヒト、91%)	135
ヒフェニルヒドロラーゼ関連タンパク質 (ヒト、75%)	145
予想されるタンパク質	
GI : 12852607	16
GI : 12840016	33, 37
GI : 12859851	59, 72, 82

3. 結論

以上の結果から、この発明の解析方法によって、ミトコンドリ

アに局在化する新規遺伝子産物を同定し、それによってこれらの機能を注釈するための迅速なアプローチが提供可能であることが示される。また、ハイスループットスクリーニング技術によって、核、小胞体、ゴルジ体、ペルオキシソーム等の各オルガネラに局在化しているタンパク質グループの同定も、それぞれのシグナルを用いることによって容易に行うことができる。この発明の方法は単純であるため、cDNA ライブラリーを構築する能力があり FACS 設備を持つ当業者ならば、過度の試験を行うことなく、容易に実施することが可能である。さらに、この方法を cDNA サブ 10 トラクション法と組み合わせることによって、例えば正常状態と疾患状態、または異なる組織の発現遺伝子との比較を行うなどといった柔軟性がさらに付与される。

産業上の利用可能性

15 以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、あらゆるオルガネラを対象として、簡便かつ正確にタンパク質局在を解析することができる新しい方法と、この方法に使用する解析用材料を提供が提供される。

請求の範囲

1. 試験タンパク質がオルガネラに局在するか否かを解析する方法であって、以下のステップ：

5 (a) インティンの一方のハーフペプチド、蛍光タンパク質の一方のハーフペプチドおよびオルガネラ標的シグナルペプチドを含む融合ペプチド (a) を真核細胞内に導入するステップ；
(b) 前記蛍光タンパク質の他方のハーフペプチドおよび前記インティンの他方のハーフペプチドを含む融合ペプチド (b) に結合した試験タンパク質を真核細胞内に導入するステップ；および
10 (c) 前記蛍光タンパク質の発する蛍光信号を検出するステップ、を含むことを特徴とするオルガネラ局在タンパク質の解析方法。

2. ステップ (a) において、信号特性の異なる蛍光タンパク質のそれぞれ一方のハーフペプチドと異なるオルガネラ標的シグナルペプチドを含む 2 種以上の融合ペプチド (a) を真核細胞内に導入し、ステップ (b) において、前記蛍光タンパク質のそれぞれ他方のハーフペプチドを含む 2 種以上の融合ペプチド (b) のそれぞれに結合した試験タンパク質を真核細胞内に導入し、ステップ
20 (c) において蛍光信号の特性を検出する請求項 1 の解析方法。

3. ステップ (a) において、融合ペプチド (a) を発現する組換えベクター (A) を真核細胞にトランスフェクションすることによって融合ペプチド (a) を真核細胞内に導入する請求項 1 または 2 の解析方法。

25 4. ステップ (b) において、融合ペプチド (b) と試験タンパク質とを一体として発現する組換えベクター (B) を真核細胞にトラ

ンスフェクションすることによって試験タンパク質および融合ペプチド (b) を真核細胞に導入する請求項 1 または 2 の解析方法。

5. インテインのハーフペプチド、蛍光タンパク質のハーフペプチドおよびオルガネラ標的シグナルペプチドを含む融合ペプチド (a)。

6. 蛍光タンパク質のハーフペプチドおよびインテインのハーフペプチドを含む融合ペプチド (b)。

7. インテインのハーフペプチド、蛍光タンパク質のハーフペプチドおよびオルガネラ標的シグナルペプチドを含む融合ペプチド (a) を発現する組換えベクター (A)。

8. 蛍光タンパク質のハーフペプチドおよびインテインのハーフペプチドを含む融合ペプチド (b) と、任意の試験タンパク質とを一体として発現する組換えベクター (B)。

9. 請求項 5 の融合ペプチド (a) または請求項 7 の組換えベクター (A) と、請求項 6 の融合ペプチド (b) または請求項 8 の組換えベクター (B) とを含むことを特徴とするオルガネラ局在タンパク質の解析用プローブセット。

10. 融合ペプチド (a) または組換えベクター (A) が発現する融合ペプチド (a) が、信号特性の異なる蛍光タンパク質のそれぞれ一方のハーフペプチドと異なるオルガネラ標的シグナルペプチドを含む 2 種以上であり、融合ペプチド (b) が、前記蛍光タンパク質の他方のハーフペプチドを含む 2 種以上である請求項 9 のプローブセット。

11. インテインのハーフペプチド、蛍光タンパク質のハーフペプチドおよびオルガネラ標的シグナルペプチドを含む融合ペプチド (a) を保有する真核細胞。

12. 請求項11の真核細胞を2以上有する細胞キット。
13. 信号特性の異なる蛍光タンパク質のそれぞれ一方のハーフペプチドと異なるオルガネラ標的シグナルペプチドを含む2種以上の融合ペプチド(a)を保有する真核細胞。
- 5 14. 請求項13の真核細胞を2以上有する細胞キット。

図 1

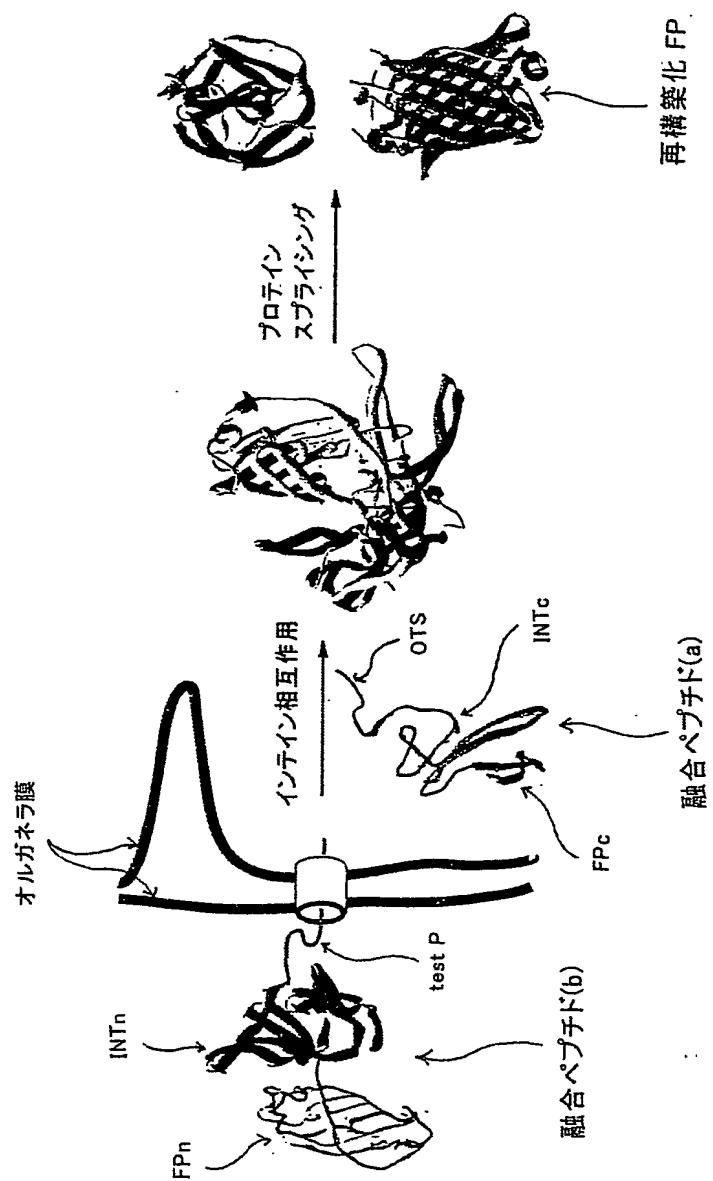


図 2

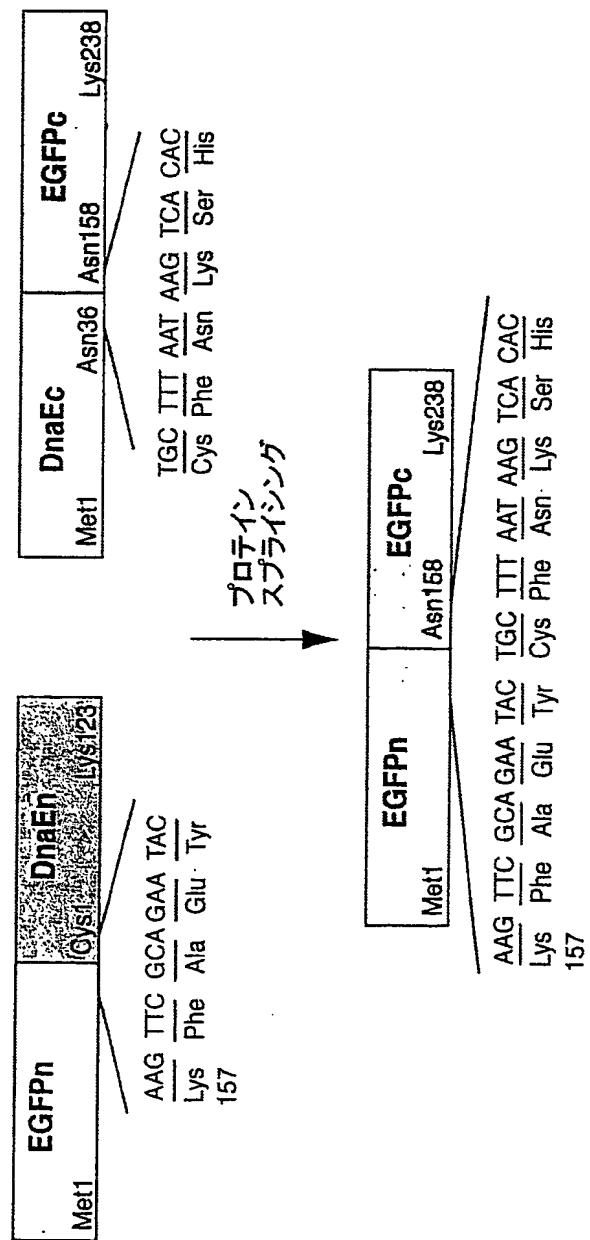


図 3

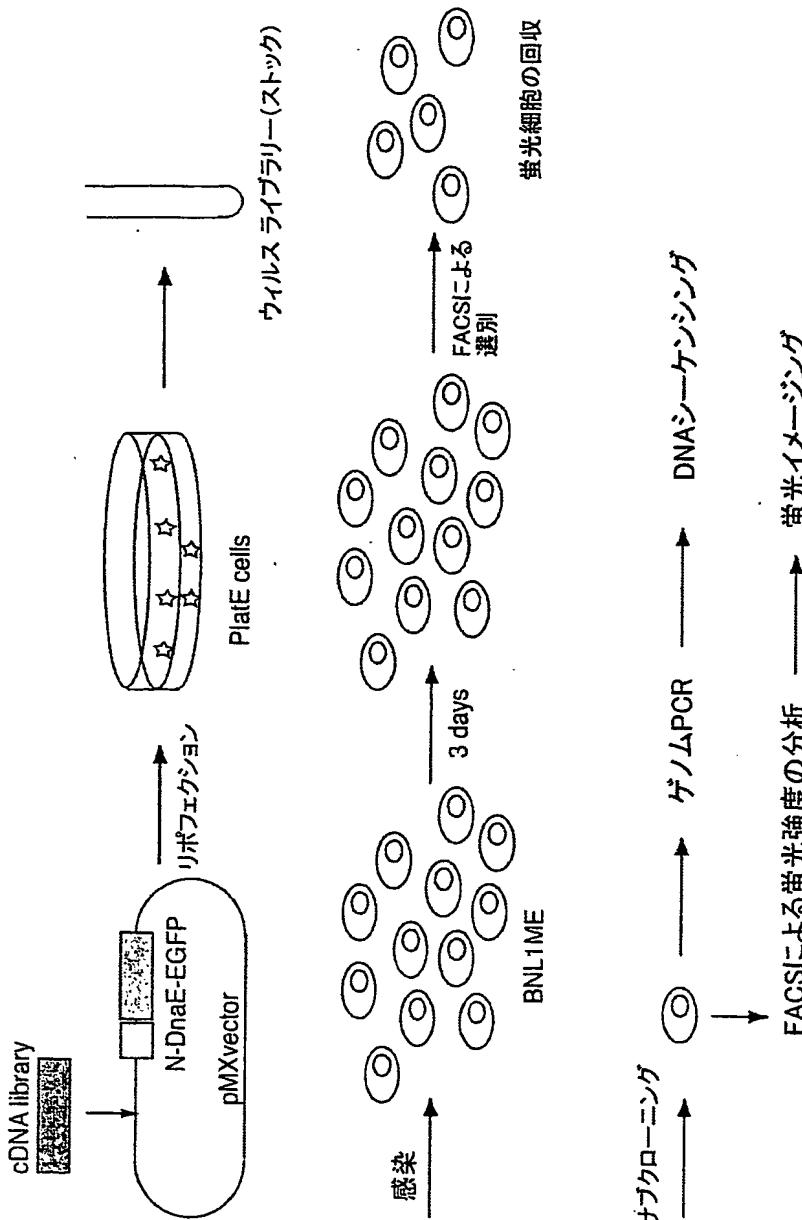


図 4

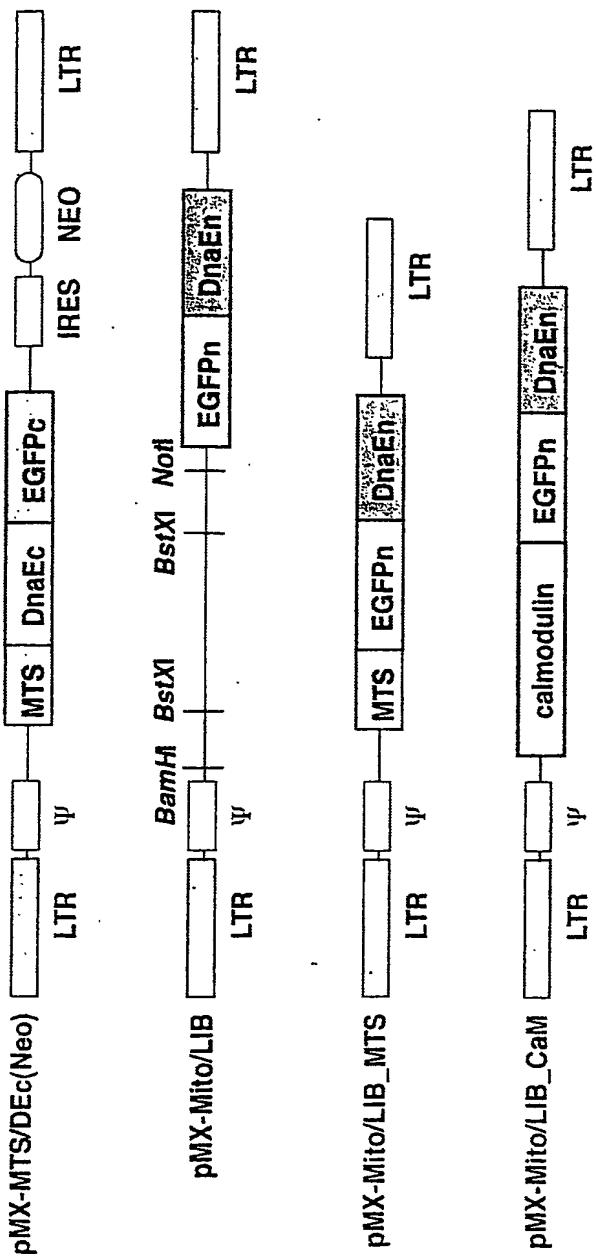


図 5

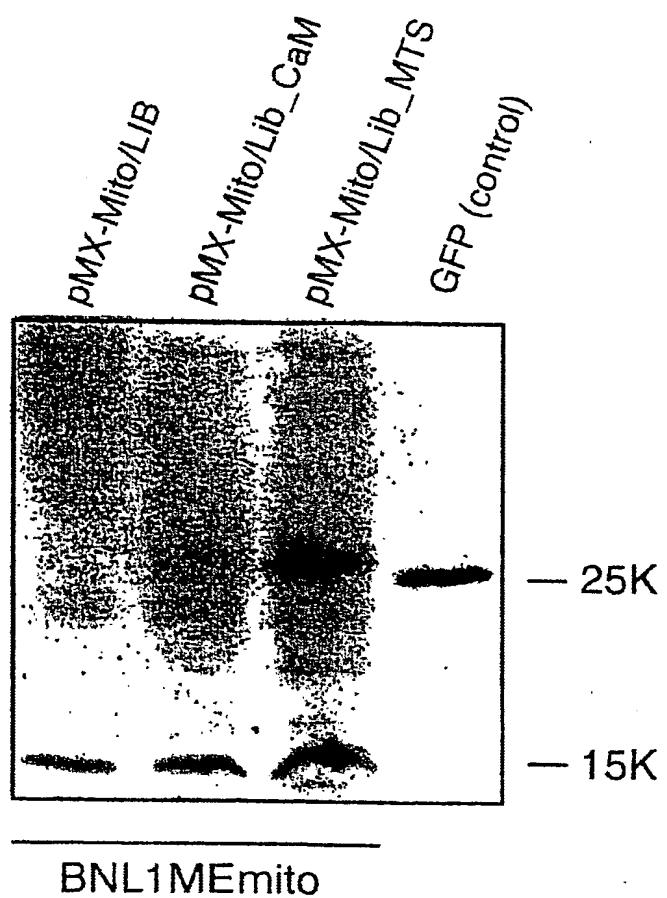


図 6

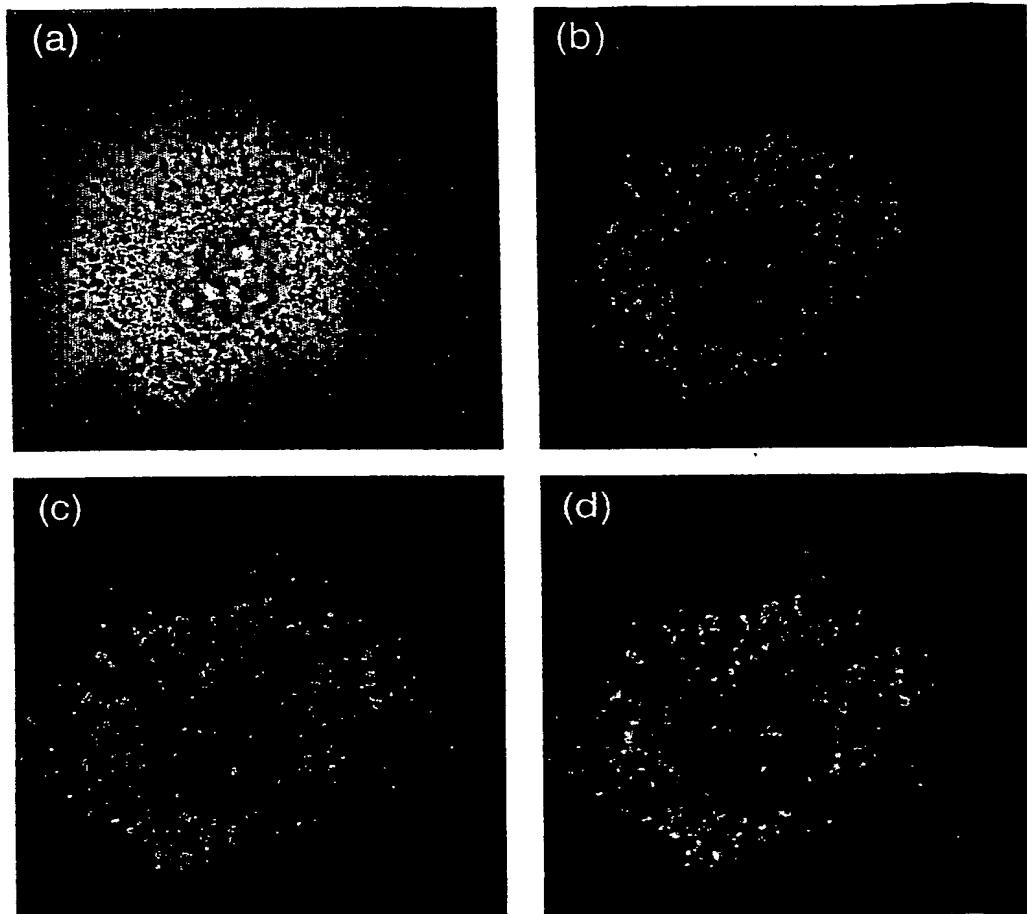


図 7

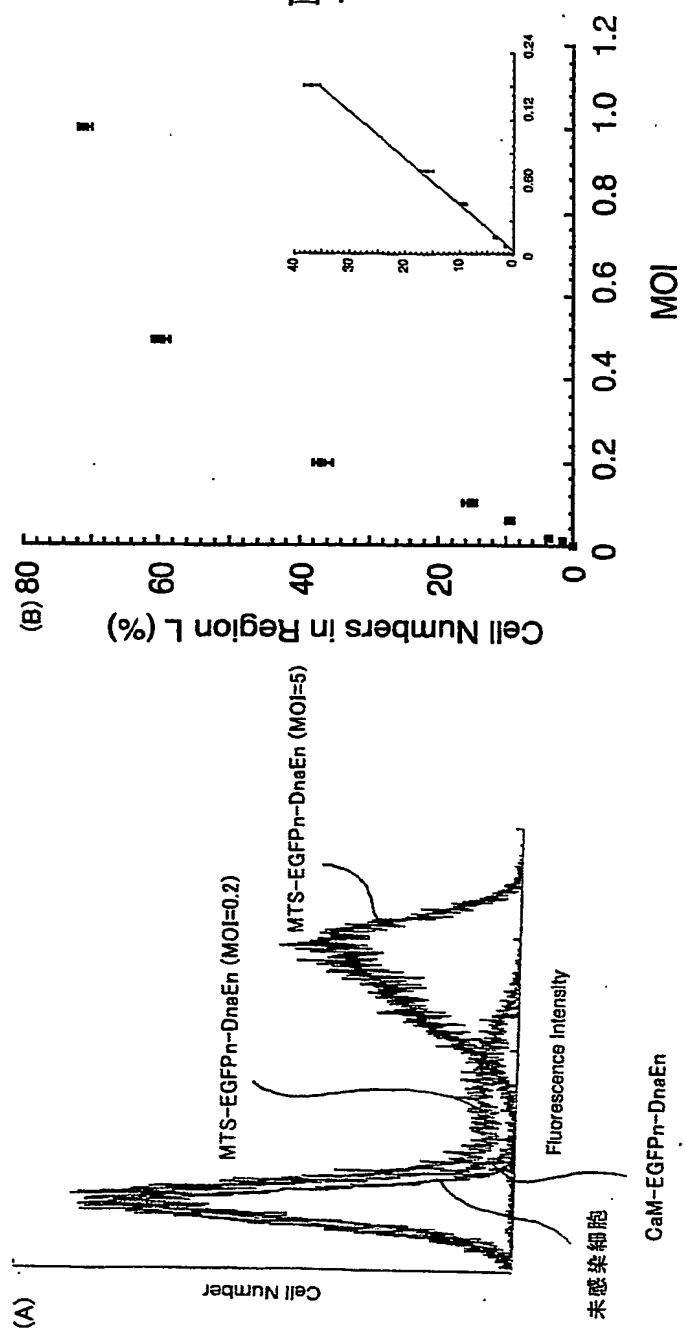


図 8

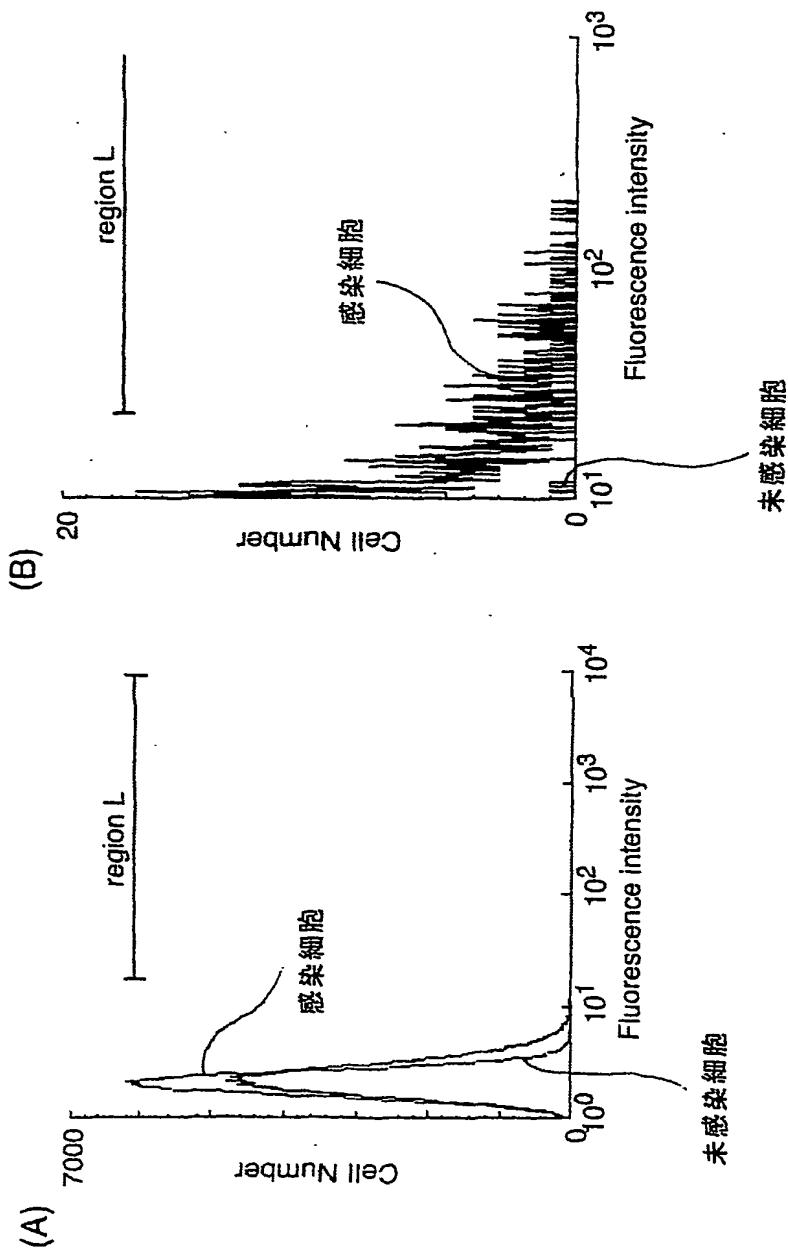
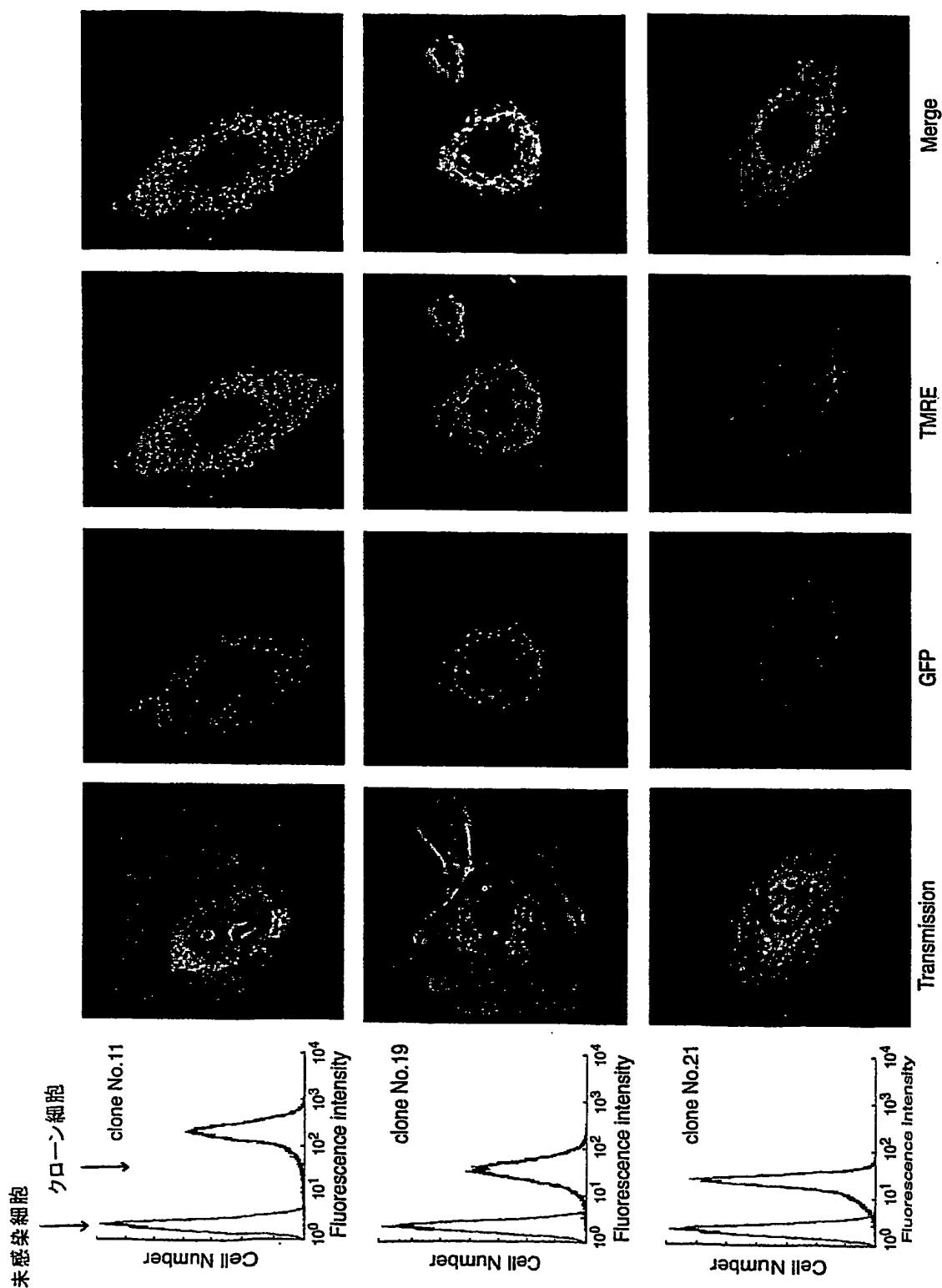


図 9



SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Analysis method for organella-localized protein and materials therefore

<130> NP02376

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligopeptide

<400> 1

Lys Phe Ala Glu Tyr Cys

1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligopeptide

<400> 2

Cys Phe Asn Lys Ser His

1 5

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 3

AGGACCTTAC ACAGTCCTGC TGACC 25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 4

GCCCTCGCCG GACACGCTGA ACTTG 25

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 5

CCGCCCTCAA AGTAGACGGC ATCGCAGC 28

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 6

CGCCGTCCAG CTCGACCAAGG AT 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11156

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/00, C12Q1/00, C07K19/00, C12N5/10, G01N33/68,
G01N33/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90, C07K19/00, C12N5/10, G01N33/68, G01N33/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPLUS FILE (JOIS),
SwissProt/PIR/Genebank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/71701 A1 (NEW ENGLAND BIOLABS, INC.), 30 November, 2000 (30.11.00), & EP 1183346 A1 & JP 2003-505012 A	1-14
A	OZAWA, T. et al., A fluorescent indicator for detecting protein-protein interactions in vivo based on protein splicing., Anal.Chem., 2000, Vol.72, pages 5151 to 5157	1-14
A	OZAWA, T. et al., Protein splicing-based reconstruction of split green fluorescent protein for monitoring protein-protein interactions in bacteria: Improve sensitivity and reduced screening time., Anal.Chem., 2001, Vol.73, pages 5866 to 5874	1-14

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01 October, 2003 (01.10.03)Date of mailing of the international search report
14 October, 2003 (14.10.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/11156

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1229330 A1 (Japan Science and Technology Corp.), 07 August, 2002 (07.08.02), & WO 02/08766 A1	1-14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/00, C12Q1/00, C07K19/00, C12N5/10, G01N33/68, G01N33/48

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/00-15/90, C07K19/00, C12N5/10, G01N33/68, G01N33/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA(STN), BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), JSTPLUSファイル(JOIS)

SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 00/71701 A1 (NEW ENGLAND BIOLABS, INC.) 2000.11.30 & EP 1183346 A1 & JP 2003-505012 A	1-14
A	OZAWA T. et al., A fluorescent indicator for detecting protein-protein interactions in vivo based on protein splicing. Anal. Chem., 2000, Vol. 72, p. 5151-5157	1-14

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す、
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論
の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに
よって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日
以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する
文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

国際調査を完了した日
01.10.03

国際調査報告の発送日

14.10.03

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号特許庁審査官 (権限のある職員)
鈴木 恵理子

4 B 3037

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	OZAWA T. et al., Protein splicing-based reconstruction of split green fluorescent protein for monitoring protein-protein interactions in bacteria: Improve sensitivity and reduced screening time. Anal. Chem., 2001, Vol. 73, p. 5866-5874	1-14
A	EP 1229330 A1 (科学技術振興事業団) 2002. 08. 07 & WO 02/08766 A1	1-14

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.